

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申 請 者 氏 名      大澤 昂平

横浜市立大学大学院医学研究科    医科学専攻    顎顔面口腔機能制御学

### 審      査      員

主    査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	高橋 秀尚
副    査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	市川 靖史
副    査	横浜市立大学大学院医学研究科准教授	西村 剛志

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP4 regulates cell migration through Orai1

(プロスタグランディン E<sub>2</sub>受容体 EP4 は Orai1 を介して細胞遊走を調節する)

口腔がんにおいて頸部リンパ節転移は予後を決める最も重要な因子の 1 つであり、口腔がんの進行ステージと関連していると報告されている。一方、EP4 は Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)受容体の 1 つである。EP4 が大腸がんや肺がんにおいて細胞の遊走能や転移能に深く関わっていることが報告されているが、そのメカニズムは不明であり、口腔がんにおいては、がん発症への関与自体が不明であった。今回、我々は口腔がん細胞の遊走能における EP4 の関与、およびその Ca<sup>2+</sup>関連シグナル伝達に注目し、がん細胞遊走におけるメカニズムについて検討した。

本研究では、EP4 が口腔がん細胞の遊走能に関与していることを明らかにした。また、肺転移モデルマウスを使用して EP4 の転移能への影響を調べたところ EP4 ノックダウン細胞では、有意に転移能が低下することが明らかになった。さらに EP4 と遊走能のメカニズムを調べるために遊走能との関わりが報告されている Ca<sup>2+</sup>に注目し、実験を行ったところ EP4 刺激時に細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇を確認した。EP4 と Ca<sup>2+</sup>の関わりが示唆されたため、免疫沈降で EP4 と結合するタンパク質を解析したところ、Ca<sup>2+</sup>チャネルである Orai1 と結合することを発見した。そこで、Orai1 ノックダウン細胞を使用し、実験を行ったところ Orai1 ノックダウン細胞では EP4 刺激時でも遊走能は亢進せず、細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇も生じなかった。このことから EP4 は、Orai1 と結合し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を調節していることが示唆された。興味深いことに、EP4 刺激によって、遊走能と深く関わりのある ERK のリン酸化が生じることがわかり、ERK のリン酸化は Orai1 をノックダウンした細胞では EP4 刺激時でも生じなかった。さらに、EP4 刺激によってがんの浸潤に関わる MMP-2, MMP-9 の遺伝子発現が上昇し、それらの活性も上昇することがわかった。これらのことから、EP4 は口腔がん細胞の遊走、転移に深く関わっていることが示され、そのメカニズムとして Orai1 を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入が生じていることが明らかになった。

本研究では、EP4 が Orai1 と結合し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>を調節することで細胞遊走能を亢進させることを明らかにした。本研究では、他の悪性腫瘍や正常細胞でも明らかとなっていない新規のがん関連シグナル伝達経路の存在を示唆しており、今後のがん治療の発展に大きく貢献することが期待できる。

審査にあたり、以上の論文要旨の説明の後に以下の質疑応答が行われた。

まず、西村副査より以下の質問、コメントがなされた。

1.  $\text{Ca}^{2+}$ が細胞遊走につながる報告は過去にあるのか。
2. 遊走能亢進がなぜ転移に結び付くのか。
3. 標的タンパク質をノックダウンすることによって細胞の形態に変化はないのか。

これらの質問に対して、以下の回答を行った。

1. 過去に悪性黒色腫の細胞を使用した実験で  $\text{Ca}^{2+}$ が ERK を介し、細胞遊走能を亢進させるという報告がある。
2. 細胞の遊走能が亢進することで、がん細胞の浸潤等が生じ、転移能亢進に結び付くと考えられる。
3. 顕微鏡で観察できる範囲では Control shRNA を導入した細胞と大きく変わらない。

次に市川副査より以下の質問、コメントがなされた。

1. 口腔がんにおいて  $\text{PGE}_2$ が、がんの増悪にどのように関与すると考えるか。
2. 今回の動物実験は遊走能を評価するのに適切なモデルか。
3. EP4 を刺激することによって増殖能は亢進していないのか。

これらの質問に対して、以下の回答を行った。

1. 過去の報告で他の悪性腫瘍と同様に、口腔がんにおいても  $\text{PGE}_2$ ががんの増悪に関与すると報告されている。また口腔という特殊な環境では口腔常在菌やたばこ等の刺激により  $\text{PGE}_2$ 等の炎症性物質が産生され、がんの増悪に関与するものと思われる。
2. 今回の動物実験で使用したモデルは肺転移モデルであるため、転移能を評価している。遊走能を評価する目的では別のモデルが必要であると考えている。
3. 実験で使用した試薬やノックダウンによる影響が、本研究の遊走能を評価した時間内において増殖能に影響しないことを確認している。

最後に高橋主査より以下の質問、コメントがなされた。

1. E-カドヘリンの発現はどのようにになっているか。
2. Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)に関与する因子はどのようになっていると考えられるか。

3. EP1~4 において、機能の違いはあるのか.
4. 今回のシグナル伝達経路に関して、Protein kinase C (PKC)の関与はどのように考えるか.

これらの質問に対して、以下の回答を行った.

1. 口腔がん細胞(HSC-3)において EP4 agonist 刺激における N-カドヘリンの mRNA の発現上昇を確認している.
2. EMT に関与する因子として TGF- $\beta$  の関与が報告されており, 本研究で EP4 agonist 刺激における TGF- $\beta$  の mRNA の発現上昇を確認している.
3. 受容体の構造上の違いではなく, 共役する G 蛋白質に違いがあるとされている. EP1-EP3 と Orai1 の関わりは今後検討していきたいと考えている.
4. PKC は  $\text{Ca}^{2+}$ に依存するキナーゼとして知られており, 下流には MAP キナーゼ・カスケードがあることが知られている. 本研究においても  $\text{Ca}^{2+}$ と MAP キナーゼ・カスケードの間に PKC が存在する可能性は大いに考えられる.

上記以外にも, 審査員の様々な質問に対して適切な返答を行った. 本研究で示した EP4 に関するシグナル経路は悪性腫瘍に限らず, 正常細胞を含め過去に報告がなく, 学術的意義は高いと考えられる. また, 研究の将来性も大いに見込まれる.

以上の審査の結果より, 申請者は医学博士の学位を授与されるに値すると総合的に判断された.